



Ag

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 31/70, C07H 21/04, C12N 15/48</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/31642</p> <p>(43) 国際公開日 1997年9月4日(04.09.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00546</p> <p>(22) 国際出願日 1997年2月26日(26.02.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/63915 1996年2月27日(27.02.96) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 梶 昭(KAJI, Akira)[JP/JP] 〒203 東京都東久留米市大門町1-1-9 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 葛和清司, 外(KUZUWA, Kiyoshi et al.) 〒102 東京都千代田区麹町3丁目2番地 相互麹町第一ビル 葛和国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: ANTI-HIV AGENT</p> <p>(54)発明の名称 抗HIV剤</p> <p>(57) Abstract An anti-HIV agent comprising an antisense DNA hybridizable with the region on the (3') direction side of a splice donor site in the nucleotide sequence participating in HIV-1 RNA dimerization, in particular, with the sequence that corresponds to the one ranging from the position No. 773 to the position No. 789 of the HXB2 nucleotide sequence and that is present in the HIV-1 RNA.</p>		

(57) 要約

HIV-1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列中のスプライス ドナー サイトの3' 位方向側の領域、特にHXB2のヌクレオチド配列773から789までに相当する配列でHIV-1 RNAに存在する配列にハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有することを特徴とする抗HIV剤。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TG	トゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	マラウイ	TR	トルコ
CF	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CH	スイス	KR	韓国	NL	オランダ	US	米国
CI	コート・ジボワール	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	LI	リヒテンシュタイン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CN	中国	LK	スリランカ	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
CZ	チェコ共和国			RO	ルーマニア		
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						

## 明 細 書

## 抗H I V剤

## [技術分野]

本発明は、アンチセンスDNAを含有する抗H I V剤に関するものであり、詳しくは、H I V-1（ヒト免疫不全ウイルス タイプ-1）による疾患について、H I V-1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列とハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有する抗H I V剤に関するものである。

0 0 0 2]

## [背景技術]

H I V-1に存在する一本鎖遺伝子RNAの二量化は、このウイルスのライフサイクルのいくつかのステップの制御、例えば、（1）二量化はコア殻形成およびウイルス形成の前提である、（2）二量化はプロバイラル（proviral）DNA合成にとって重要である、等に関与するため、極めて重要であると報告されている[J. Mol. Biol., 229, p. 382-397 (1993)参照]。従って、このステップを攻撃する薬剤はH I V-1の増殖を抑制することになり、新規な作用メカニズムに基づく医薬として期待される。

一方、H I V-1 RNAの二量化に関与する領域を持つ部分H I V-1 RNAは、H I V-1 RNAと同じ領域で二量化すること、および種々のイオンに対する挙動についても両者はほぼ同じ性質を有していることが報告されている[J. Biol. Chem., 270, p. 8209-8216 (1995)参照]。従って、H I V-1 RNAの二量化に関する多くの研究は、部分H I V-1 RNAを用いて行われている。

最近の研究から、H I V-1 RNAの二つの領域が二量化に関与していることが報告され、その二量化に関するスプライス ドナー サイト（Splice donor site）の5' 位方向側の領域のヌクレオチド配列については正確に決定されている[J. Biol. Chem., 270, p. 8209-8216 (1995) 参照]。しかし、他方のスプライス ドナー サイトの3' 位方向側の領域については、未だ研究が行われておらず、二量化に必須なヌクレオチド部分の配列については決定されていない。

## [発明の開示]

本発明者は、上記背景技術のもとで、H I V - 1 RNA二量化を阻害するアンチセンスDNAの配列について鋭意研究したところ、H I V - 1 RNAの二量化における上記未決定の領域のヌクレオチド配列を決定するとともに、この領域でハイブリッド形成するアンチセンスDNAを見出した。特に、H I V - 1 RNAのヌクレオチド配列が773から789 [ヌクレオチドの配列番号はジーンバンク (G e n b a n k) 登録番号K 0 3 4 5 5によるものである。AIDS RESEARCH & HUMAN RETROVIRUS (1987) Vol. 3, p. 57~69] までに相当するRNA配列を有するヌクレオチド領域とハイブリッド形成するアンチセンスDNAは、二量化を阻害するばかりでなく、H I V - 1 RNAダイマーをモノマーに解離させるという新しい知見を得た。

すなわち、本発明はH I V - 1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列中のスプライス ドナー サイトの3' 位方向側の領域とハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有することを特徴とする抗H I V剤を提供するものである。

また、本発明はH I V - 1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列中のスプライス ドナー サイトの3' 位方向側であって、H X B 2のヌクレオチド配列773から789までに相当する配列でH I V - 1 RNAにある配列にハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有することを特徴とする抗H I V剤を提供するものである。

さらにまた、本発明は、H I V - 1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列中のスプライス ドナー サイトの3' 位方向側であって、H X B 2のヌクレオチド配列771から792までに相当する配列でH I V - 1 RNA配列にあるハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有することを特徴とする抗H I V剤を提供するものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

一般に、H I Vは、その核酸配列が非常に変異しやすいがRNAが二量体結合をすることは全てのH I Vに共通する性質である。したがって、H X B 2を用いて発見された、後述する二量体結合に重要な配列は各H I Vについて若干異なる可能性がある。したがって、以下においては、H I V - 1 RNAの二量化に関

与するヌクレオチド配列としてHXB 2を例示して説明するが、本発明は、二量体形成に関するこの配列に相当する全てのHIVに存在する配列に対するアンチセンスに関するものである。

まず、HIV-1のHXB 2クローンから出発し、常法にしたがってこの転写DNA（配列番号455-1170、以下配列番号のみを記す）を含む組換えプラスミドを増幅させ、ついで制限酵素Pvu IIを用いて1146の位置で切断し、ついで逆転写により部分HIV-1 RNA（455-1146）を得た。該部分HIV-1 RNA（455-1146）は、1mM MgCl<sub>2</sub>および100mM KClを含む緩衝液（ダイマー形成緩衝液）で処理することによりダイマーに変換させる。変換された部分HIV-1 RNA（455-1146）ダイマーの100mM LiCl、NaCl、KClまたはCsCl存在下における熱安定性を、完全なHIV-1 RNAダイマーのものと比較したところ、T<sub>m</sub>（融解温度）値は用いたイオンに関係なく約35℃を示し、同程度であった。このことは、部分HIV-1 RNA（455-1146）がHIV-1 RNAのモデルとして適していることを、強く支持するものである。

本発明者は、部分HIV-1 RNA（455-1146）の二量化を阻害するDNAオリゴマーを発見すべくHIV-1 RNAのヌクレオチド（731-850）に相補的なDNAオリゴマー（13～22個の核酸からなる）を用いて検討したところ、ヌクレオチド部分（773-789）をカバーするアンチセンスDNA〔例えば、R3（771-790）、R3d（770-789）、R3e（771-792）、R3f（773-790）、R3g（773-792）〕が有効であり（後記実施例1参照）、ヌクレオチド一個でもこの領域から3'位または5'位方向にずれたもの〔例えば、R3c（769-788）、R3h（774-793）〕は不活性であるという新規な知見を得た。

更に、本発明者は、上記の活性なアンチセンスDNAが部分HIV-1 RNA（455-1146）ダイマーをモノマーに分解できるか否かを確かめる実験を行った。その結果、ヌクレオチド部分（773-789）をカバーするア

ンチセンスDNAは、用量依存的にRNAダイマーを効果的にモノマーに分解するという事実を見出した（後記実施例2参照）。本発明は、かかる知見に基づいてなされたものである。

本発明の抗HIV剤に用いられるアンチセンスDNAは、遺伝子組換え法のほか、オリゴヌクレオチド合成に用いられる固相ホスホルアミダイト法等の通常用いられる化学合成法により得ることができる。また、本発明の抗HIV剤の有効成分であるアンチセンスDNAは、市販品として購入することもできる。

本発明の抗HIV剤は、上記の如き特徴をもつアンチセンスDNAを、通常の医薬品製剤に用いられる適当な溶剤、賦形剤、補助剤などの添加剤を使用して、製剤製造の常法にしたがって、液剤、注射剤、乳剤、リポソーム剤、座剤等適宜の剤形の製剤として製造することができる。製剤化にあたっては、所望のアンチセンスDNAを単独、または適宜組み合わせ用いることができ、また他の医薬活性成分を配合してもよい。

上記アンチセンスDNAは、それらに対して不活性な適当な基材と混和してクリーム剤、軟膏剤等の外用剤とすることもできる。

液剤、注射剤として製造する場合の希釈剤としては、注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、プロピレン グリコール、ポリエチレングリコール等を用いることができる。

#### 〔図面の簡単な説明〕

〔図1〕 本発明のアンチセンスDNA（オリゴヌクレオチド）による部分HIV-1 RNA二量化の阻害を示す用量作用曲線図であり、縦軸はモノマーとダイマーの合計に対するダイマーのパーセンテージを、横軸はアンチセンスDNA（オリゴヌクレオチド）の濃度を示す。

〔図2〕 本発明のアンチセンスDNA（オリゴヌクレオチド）による部分HIV-1 RNAダイマーの解離を示す用量作用曲線図であり、縦軸はモノマーとダイマーの合計に対するモノマーのパーセンテージを、横軸はアンチセンスDNA（オリゴヌクレオチド）の濃度を示す。

#### 〔実施例〕

次に実施例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例

になんら制約されるものではない。

#### 実施例 1

アンチセンスDNAによる部分HIV-1 RNAの二量化阻害

5種類のアンチセンスDNA [R3 (771-790)、R3d (770-789)、R3e (771-792)、R3f (773-790)、R3g (773-792)] は市販品 [DNA インタナショナル インク. (International Inc.) 製] を用いて検討した。熱変性 (約95℃、3分) したラベル化部分HIV-1 RNA [(455-1146)、6 nCi  $^{32}$ P/o. 5  $\mu$ g] の水溶液 7  $\mu$ l に、図1に示された濃度となるようアンチセンスDNA水溶液 1  $\mu$ l および5倍の濃度のダイマー形成緩衝液 2  $\mu$ l を加え、それぞれ最終濃度 (50 mM ソディウム カコディレート、100 mM KCl および1 mM  $MgCl_2$ ; pH約7.5) のものとする。10  $\mu$ l の反応混合物を、37℃で1時間インキュベートした後、サンプル全量をアガロースゲル電気泳動にかけ、ダイマーおよびモノマーを分離し、ついで各々をオートラジオグラフィにより検出した。ダイマーの生成率 (%) はデンストメトリーから求めた。それらの結果を図1に示す。

#### 実施例 2

アンチセンスDNAによる部分HIV-1 RNAダイマーの分解

熱変性した $^{32}$ Pラベル化部分HIV-1 RNA [(455-1146)、8 nCi、0.5  $\mu$ g] の水溶液 8  $\mu$ l に、実施例1と同じダイマー形成緩衝液 2  $\mu$ l を加え、37℃で1時間インキュベートして二量化した後、図2に示された濃度となるようアンチセンスDNA (実施例1において用いられたR3、R3e、R3f、R3g) の水溶液 1  $\mu$ l を加え11  $\mu$ l とした。反応混合物を、37℃で1時間インキュベートした後、サンプル全量をアガロースゲル電気泳動にかけ、ダイマーおよびモノマーを分離し、ついで各々をオートラジオグラフィにより検出した。モノマーの生成率 (%) はデンストメトリーから求めた。それらの結果を図2に示す。

次に、本発明の抗HIV剤の製剤例を示す。

[製剤例]

### 製剤例 1

アンチセンスDNA R3 (771-790) 20 gを等張のブドウ糖水溶液に加えて1リットルとし、所定容量のアンプルに充填して注射剤とする。

この注射剤は、症状に合わせて1回1～5 ml量を感染患部になるべく近いところに投与する。

### 製剤例 2

アンチセンスDNA R3e (771-792) 10 gを等張のブドウ糖水溶液に加えて1リットルとして1%濃度の点眼液とする。

この点眼剤は、症状に合わせて1回2～3滴、1日数回点眼する。

### 製剤例 3

アンチセンスDNA R3e (771-792) 1 gに、精製カカオ脂 999 gを加えて60℃の水浴上で練合した後、成形して1個当たり2 gの座剤とする。

### 製剤例 4

アンチセンスDNA R3 (771-790) 20 g、大豆油100 g、精製卵黄レシチン12 g、オレイン酸0.5 g、グリセリン25 g、0.1N-苛性ソーダ5 mlをホモミキサーで分散し、注射用蒸留水で1リットルとする。該混合物を、乳化機を用いて乳液を調製する。この乳液を121℃、20分間高圧蒸気滅菌処理を施して乳剤とする。

次に、本発明の抗HIV剤の安全性について、試験例を示し説明する。

### 試験例 1

BALB/Cマウスに、100  $\mu$ g/KgアンチセンスDNA R3e (1771-792)を腹腔内投与したところ死亡例を認めなかった。

ここで示されたように、本発明の抗HIV剤は、例えば上記のアンチセンスDNA R3e (771-792)の有効投与量において安全であることが確認された。



## 請 求 の 範 囲

1. HIV-1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列中のスプライスドナー サイトの3' 位方向側の領域とハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有することを特徴とする抗HIV剤。
2. HIV-1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列中のスプライスドナー サイトの3' 位方向側であって、HXB 2のヌクレオチド配列773から789までに相当する配列でHIV-1 RNAにある配列にハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有することを特徴とする抗HIV剤。
3. HIV-1 RNAの二量化に関与するヌクレオチド配列中のスプライスドナー サイトの3' 位方向側であって、HXB 2のヌクレオチド配列771から792までに相当する配列でHIV-1 RNA配列にあるハイブリッド形成するアンチセンスDNAを含有することを特徴とする抗HIV剤。

Fig. 1

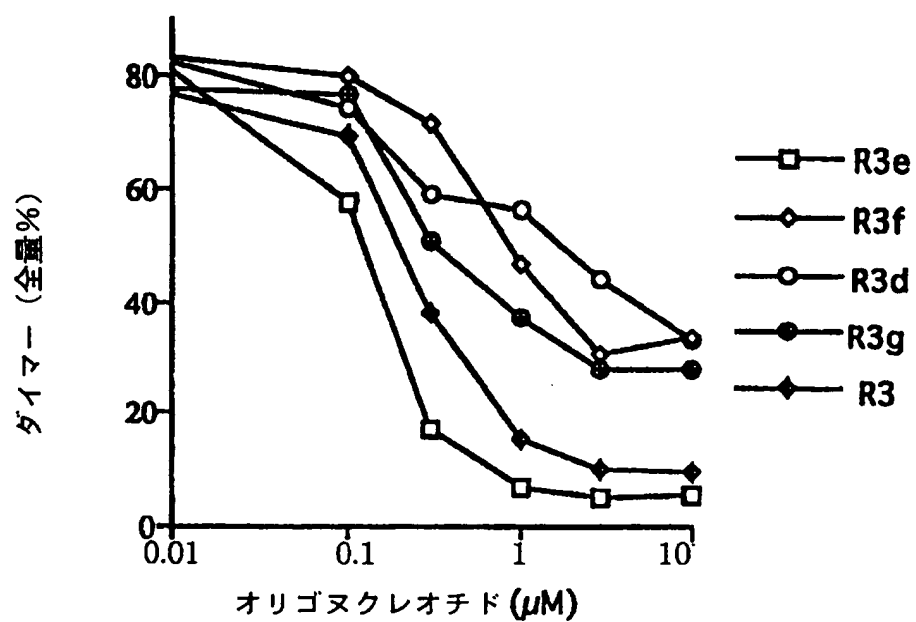
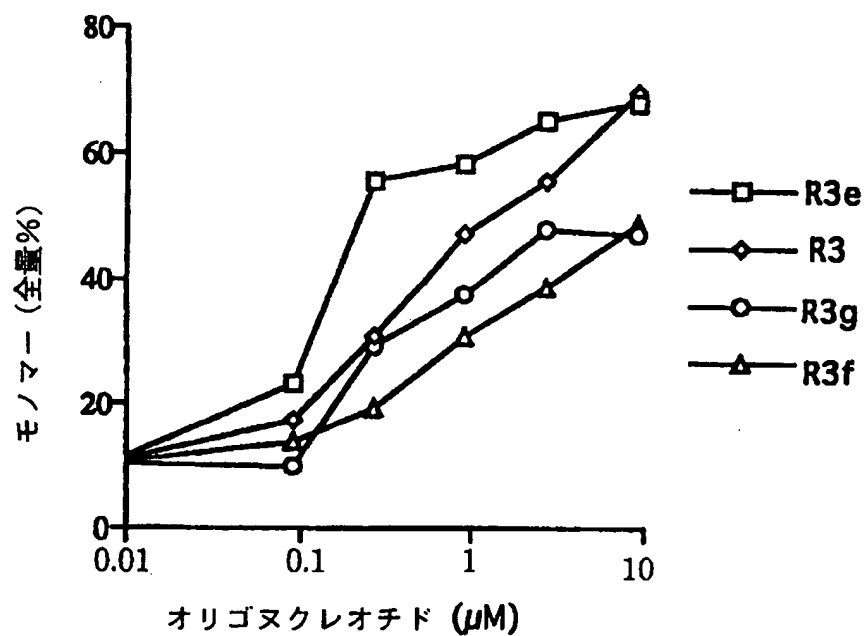


Fig. 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00546

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> A61K31/70, C07H21/04, C12N15/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> A61K31/70, C07H21/04, C12N15/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	S. Zhang et al., Only a very specific antisense 20mer oligodeoxynucleotide inhibits HIV RNA dimer formation, Abstracts of the General Meeting of American Society for Microbiology, Vol. 95(1995) p. 585	1 2, 3
Y A	R. Marquet et al., Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism, Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 9 (1991) p. 2349-2357, Abstract, Introduction	1 2, 3
PX PA	E. Skripkin et al., Mechanisms of inhibition of in vitro dimerization of HIV type 1 RNA by sense and antisense oligonucleotides, J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 46 (1996) p. 28812-28817, Abstract, Fig. 1, last paragraph of Discussion	1 2, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

May 27, 1997 (27. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

June 10, 1997 (10. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>6</sup> A61K31/70, C07H21/04, C12N15/48

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>6</sup> A61K31/70, C07H21/04, C12N15/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	S. Zhang et al., Only a very specific antisense 20mer oligodeoxynucleotide inhibits HIV RNA dimer formation, Abstracts of the General Meeting of American Society for Microbiology, Vol. 95 (1995) p. 585	1 2, 3
Y A	R. Marquet et al., Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism, Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 9 (1991) p. 2349-2357, Abstract, Introduction	1 2, 3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 05. 97

国際調査報告の発送日

10.06.1997

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 美香

4C

9551

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PA	E. Skripkin et al., Mechanisms of inhibition of in vitro dimerization of HIV type 1 RNA by sense and antisense oligonucleotides, J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 46 (1996) p. 28812-28817, Abstract, Fig. 1, Discussionの最終段落	1 2、3